

## Niveles séricos de los marcadores tradicionales de daño cardíaco: CK total, CKMB, LDH total, LDH-1 y LDH-2 en ratones inoculados con veneno de *Crotalus durissus cumanensis*

Serum's level of the traditional markers for cardiac damage: Total-CK, CKMB, Total LDH, LDH-1 and LDH-2 in mice injected with *Crotalus durissus cumanensis*'s venom

Pérez-Urrieta M.C.<sup>1</sup>, Colmenarez D.<sup>1</sup>, Álvarez C.R.<sup>2</sup>, Mogollón A.A.<sup>2</sup>, Noriega-Alvarado J.R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Área de Bioquímica, Decanato de Ciencias Veterinarias, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado",

<sup>2</sup>Laboratorio de Toxicología, Decanato de Ciencias Veterinarias, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado"

Telf. 0251-2592423 Fax. 0251-2592404. E-mail: mirlenyperez@ucla.edu.ve

### RESUMEN

Se determinó el efecto que produce el veneno crudo de *Crotalus durissus cumanensis* sobre los marcadores enzimáticos de lesiones cardíacas en ratones NMRI, *CK Total (CK-T)*, *CK-MB*, *LDH-Total (LDH-T)*, *LDH-1* y *2*. Los niveles séricos de *CK-T* a las 3 y 12 horas (1486,15 y 808,8 U/L, respectivamente) mostraron diferencia significativa con respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ) mientras que a las 6 horas la diferencia es altamente significativa (5828,25 U/L) ( $p < 0,01$ ), lo cual indica que el veneno de cascabel induce aumentos en los niveles de *CK-T* hasta un pico máximo a las 6 horas, para luego disminuir. Para la *CK-MB* hubo diferencia altamente significativa entre los grupos experimentales y control a las 3 y 6 horas post inoculación del veneno (1142,2 y 3179,36 U/L); sin embargo, a las 12 y 24 horas no se encontró diferencia. La *LDH-T* presentó diferencia altamente significativa a las 12 y 24 horas post-inoculación con una media de 6172 y 5493,4 U/L, respectivamente, no hubo diferencia significativa a las 3 y 6 horas, contrario a la *CK-T*. La *LDH-1* alcanzó una diferencia altamente significativa a las 12 horas (563 U/L) y 24 horas (393.1 U/L) post-inoculación, mientras que la *LDH-2* mostró un comportamiento similar a la *LDH-1*. Estos resultados muestran que los niveles séricos de *CK-T*, *CK-MB*, *LDH-T*, *LDH-1* y *2* se ven afectados por el veneno de *Crotalus durissus cumanensis*, lo cual puede ser indicativo de daño a nivel del músculo cardíaco.

Palabras clave: Veneno, *Crotalus*, corazón, creatinasa

### ABSTRACT

The effect of the crude venom of *Crotalus durissus cumanensis* on the enzymatic markers of cardiac injuries in mice NMRI were determinate, measuring *Total CK (CK-T)*, *CK-MB*, *Total LDH (LDH-T)*, *LDH-1* and *2*. As far as the values of *CK-T* to 3 and 12 hours (1486.15 and 808.8 U/L, respectively) there were significant differences with respect to the group control ( $p < 0.05$ ) and to 6 hours (5828.25 U/L) a highly significant difference ( $p < 0.01$ ), which indicates that the effect of the poison of on the *CK-T* increases until a maximum peak (6 and 12 hours) and it soon to decreases. For the *CK-MB* there was a high significant difference between the experimental groups and control to 3 and 6 hours post-inoculation of the venom (1142.2 and 3179.36 U/L for the experimental groups, respectively), being that to 12 and 24 hours was not significant difference the determined *LDH-T* highly threw significant difference to 12 and 24 hours post inoculation with an average of 6172 and 5493.4 U/L, respectively, and there was no significant difference to 3 and 6 hours, contraries to the *CK-T*. The *LDH-1* reached a significant difference 12 hours (563 U/L) and 24 hours (393.1 U/L) post inoculation, while the *LDH-2* showed a similar behavior to the *LDH-1*. These results show that levels of *CK-T*, *CK-MB*, *LDH-T*, *LDH-1* and *2* are affected by *Crotalus durissus cumanensis* venom, which is indicative of damage at level of the cardiac muscle.

Key words: *Crotalus*, venom, heart, creatinase

## INTRODUCCIÓN

*Crotalus durissus cumanensis* es la serpiente del género *Crotalus* más abundante en Venezuela, en especial en zonas bajas y secas, aunque en ocasiones suele encontrarse en bosques y zonas de 2500 mt sobre el nivel del mar [1]. Es importante destacar, que los venenos de estos animales poseen una gran variedad de sustancias proteicas, péptidos, aminas iones y metales responsables de muchos de sus efectos [2]. Es por ello que un accidente por *crotalus* implica una serie de alteraciones locales y sistémicas, entre las patologías locales se registran hemorragia, mionecrosis y edema; mientras que los cambios sistémicos son insuficiencia renal aguda, necrosis de tejidos, fallas respiratorias y coagulación intravascular diseminada [3, 4, 5]. Algunos órganos, como hígado y corazón, también pueden ser afectados [6, 7].

El daño a las células cardíacas puede jugar un papel importante en la patogénesis de varios desórdenes cardiovasculares que compliquen el cuadro clínico, se han establecido métodos bioquímicos que representan una herramienta importante para el diagnóstico de daño a este tejido, existen marcadores comercialmente disponibles para tal fin [8, 9]. Es así, como las isoenzimas creatin-kinasa cardíaca (CK-MB), la deshidrogenasa láctica LDH y la aspartato-amino transferasa (AST) han sido utilizados tradicionalmente como marcadores enzimáticos para el diagnóstico de necrosis miocárdicas [10,11]; particularmente la isoenzima CK-MB por su sensibilidad y bajo costo es una prueba útil en el diagnóstico y evaluación del infarto al miocardio [12].

El propósito de este trabajo fue determinar el efecto que produce el veneno de *Crotalus durissus cumanensis* sobre los marcadores enzimáticos tradicionales de lesiones cardíacas en un modelo animal, específicamente en ratones de la cepa NMRI.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó con pool de veneno obtenido por ordeño manual [13] de 10 ejemplares adultos de *Crotalus durissus cumanensis* mantenidos en cautiverio individualmente en el Laboratorio de Toxicología del Decanato de Ciencias Veterinarias de la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” (UCLA) en un terrarium de vidrio de 40 cm de largo x 40 cm de ancho x 30cm de alto con tapa de madera y malla metálica, a una temperatura diurna de 30°C y nocturna de 24°C. Todas las serpientes se alimentan una vez al mes con ratones cepa MNRI del Bioterio del DCV de la UCLA, con administración de agua *ad libitum*. Se preparó un pool de veneno tomando 200 µl de c/u y disolviendo en 1 mL de solución salina, se midió su concentración de proteínas al determinar su

absorbancia a 280 nm en el espectrofotómetro Genesys 8®. A partir de esta concentración (1,45 mg de proteínas/mL) se prepararon soluciones para inocular una dosis de 0,75 mg de proteína de veneno/Kg peso ratón y que corresponde a la Dosis Letal 50 (DL<sub>50</sub>) estimada por el método de Sperman-Krab aprobado por la WHO [14] para ser inyectadas vía intraperitoneal a cada animal de experimentación.

Se utilizaron 40 ratones NMRI procedentes del Bioterio, del DCV-UCLA divididos en 5 grupos, subdivididos a su vez en: subgrupo experimental de 5 ratones inoculados con veneno vía intraperitoneal con DL<sub>50</sub> en 50µl de NaCl 0,9%, 5 ratones (subgrupo control) inoculados con 50µl de NaCl 0,9%. Se realizó extracción de sangre de la vena caudal, a intervalos de 3, 6, 12, y 24 horas post-inyección, las muestras fueron centrifugadas a 800 g por 10 min, determinando en el suero obtenido los niveles de: CK-Total y LDH con kit de reactivo comercial (Invelab®) y analizado en Star Fax (Ü Omega IV®). Las isoenzimas CK-MB, LDH-1 y LDH-2 se determinaron por electroforesis con el sistema Helena®, utilizando kits “Creatin Kinasa Isoenzyme Electrophoresis®”, kits “Lactate Dehydrogenase Isoenzyme Electrophoresis®” (Beckman Instruments, Inc., Fullerton CA, 92634-3100®). Se utilizó gel de agarosa tamponado a pH 8,2 aplicando 100 voltios durante 20 minutos; posteriormente, se incubaron los geles con un sustrato específico para cada enzima durante 30 minutos a 45°C en cámara húmeda. La cantidad relativa de las bandas se cuantificó a 600 nanómetros, en un densitómetro Quick Scan 2000 (Helena Laboratories®) y la actividad de cada isoenzima se calculó la actividad enzimática correspondiente.

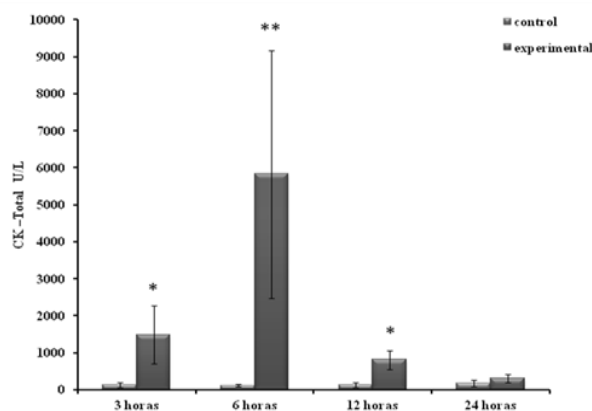
## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar la validez estadística se aplicó la prueba *t* para muestras independientes, empleando para ello el programa estadístico SPSS 11,5 para Windows® se tomó como nivel de significancia un intervalo de confianza de 95% (P<0,05) [15].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El gráfico 1 muestra los niveles de CK-Total (CK-T) en suero a las 3, 6, 12 y 24 horas. Se aprecia que a las 3 y 12 horas el grupo experimental presenta una diferencia significativa (con media para los grupos experimentales de 1486,15 y 808,8 U/L respectivamente) (p<0,05) con respecto al control y a las 6 horas la diferencia fue altamente significativa (valor medio para el grupo experimental de 5828,25 U/L)(p<0,01), lo cual muestra que el veneno de la cascabel *C. durissus cumanensis* aumenta la CK-T hasta

**Gráfico 1.** Niveles séricos de CK total en ratones NMRI inoculados con veneno de *Crotalus durissus cumanensis*. Los datos representan la media  $\pm$  la Desviación Estándar, n= 5. \* Diferencia significativa respecto al control ( $p<0,05$ ), \*\* Diferencia altamente significativa respecto al control ( $p<0,01$ ).



un pico máximo (6 horas) para luego disminuir drásticamente para no diferenciarse del control a las 24 horas. La CK-T es utilizada como indicador de lesión al miocardio por estar en mayor concentración en músculo (cardíaco, esquelético), elevándose generalmente a partir de las 6 horas luego de producido el infarto, pudiendo alcanzar hasta 20 veces por encima de su valor de referencia [12].

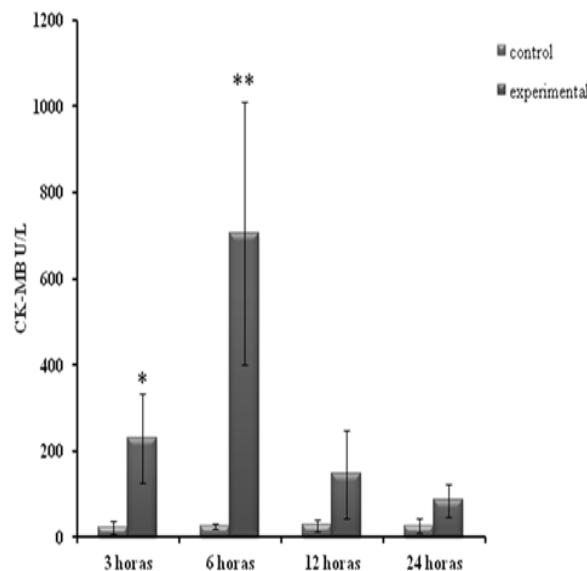
Los resultados de esta investigación se corresponden con estudios previos en donde el pico máximo para la CK-T se reportó a las 6 horas post inoculación disminuyendo a las 24 horas [16]; y con reportes histológicos en ratones inoculados con veneno de esta misma especie donde describieron alteraciones ultrestructurales de tejido cardíaco a partir de las 6 horas post inyección [7]. Otros trabajos, donde se empleó veneno de la especie *Crotalus durissus terrificus*, la actividad máxima de esta enzima se alcanzó a las 9 horas post inoculación [17]. Estudios en humanos indican que el incremento de CK-T conjuntamente con AST y LDH en pacientes víctimas de mordeduras de *Crotalus durissus terrificus* muestra un patrón similar a lo observado en infarto agudo al miocardio, con elevación de estos marcadores a partir de las 3 horas de ocurrido el evento [18]. Lo anterior refuerza la hipótesis de daño al tejido muscular cardíaco ocasionado por el veneno de *crotalus*, como consecuencia de la actividad proteolítica y hemorrágicas de las enzimas presentes en el veneno tanto de esta especie como de otras serpientes [6].

El gráfico 2 muestra el efecto del veneno de *Crotalus durissus cumanensis* sobre los niveles séricos de la isoenzima CK-MB, en ratones NMRI. Se puede

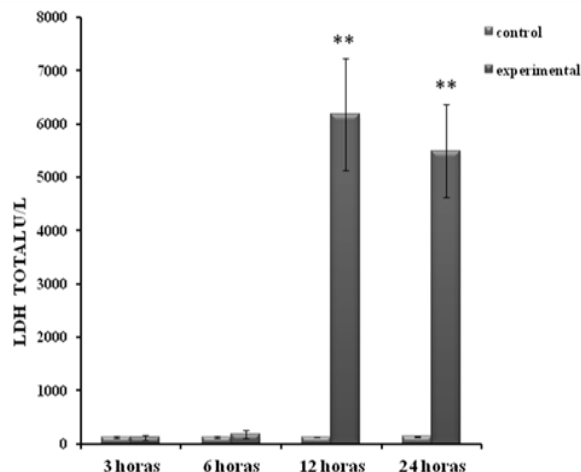
apreciar que hubo diferencia altamente significativa entre los grupos experimentales y control a las 3 y 6 horas post inoculación del veneno (1142,2 y 3179,36 U/L para los grupos experimentales respectivamente); sin embargo, a las 12 y 24 horas no se encontró diferencia significativa. Resultados de estudios con *Crotalus durissus* en Brazil reportaron niveles elevados para CK-total y CK-MB en humanos envenenados no letalmente en intervalos de tiempo similares a este estudio [19]. La isoenzima CK-MB está presente en mayor cantidad en músculo cardíaco, por esa razón ha sido utilizado durante décadas como uno de los criterios para diagnóstico de infarto agudo al miocardio [20]. La CK-MB se eleva entre las 3 a 6 horas y vuelve a la normalidad entre las 12 a 48 horas tras un infarto de miocardio, de allí que se realicen mediciones secuenciales para ver la evolución del paciente [12]. Los hallazgos en este trabajo, en donde a partir de las 12 horas post inoculación los niveles del grupo experimental no muestran diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control, coinciden con los reportes en humanos con infarto al miocardio y con lo reportado en estudios de microscopia electrónica, en donde se evidenció daño de leve a severo en cardiomiocitos y daño endotelial vascular con consecuente daño isquémico [6].

El gráfico 3 muestra los valores de LDH-Total (LDH-T) determinados en ratones inoculados con veneno de

**Gráfico 2.** Niveles séricos de la isoenzima CK-MB en ratones NMRI inoculados con veneno de *Crotalus durissus cumanensis*. Los datos representan la media  $\pm$  la Desviación Estándar, n= 5. \* Diferencia significativa respecto al control ( $p<0,05$ ), \*\* Diferencia altamente significativa respecto al control ( $p<0,01$ ).



**Gráfico 3.** Niveles Séricos de LDH Total en ratones NMRI inoculados con veneno de *Crotalus durissus cumanensis*. Los datos representan la media  $\pm$  la Desviación Estándar, n= 5. \* Diferencia significativa respecto al control ( $p<0,05$ ), \*\* Diferencia altamente significativa respecto al control ( $p<0,01$ ).



*Crotalus durissus cumanensis*, donde se observa una diferencia altamente significativa a las 12 y 24 horas post inoculación, con una media de 6172 y 5493,4 U/L, respectivamente, y no se encontró diferencia significativa entre las 3 y 6 horas contrario con lo ocurrido con CK-T. Los niveles de LDH-T luego de un ataque cardíaco aumentan de manera más tardía que la CK-T, siendo los registros entre 24 y 72 horas posteriores al infarto [12]. Los resultados de este trabajo, en cuanto a los niveles de LDH-T, se relacionan con trabajos anteriores realizados con la misma serpiente donde se registró un incremento significativo para LDH-T a las 3 y 6 horas y altamente significativo a las 12 y 24 horas post inyección de veneno a ratones Balb/C [16]. Poco se conoce del efecto del veneno de sobre los niveles séricos de LDH-T y sus isoformas; sin embargo, en otras especies como *Bothrops brazili hogue* se muestra una elevación de LDH-T y sus niveles desde la media hora de inoculación hasta la primera hora, provocando un incremento en su concentración de casi 14 veces su valor inicial en ratones inoculados [21]. Otros autores han reportado que el veneno de *Bungarus coeruleus* produce un aumento del 6% de la actividad de la LDH-T en ratones de experimentación [22].

El gráfico 4 muestra la actividad de la LDH-1 en ratones inoculados con veneno crudo de *Crotalus* a diferentes intervalos; se puede observar que hubo diferencia altamente significativa a las 12 horas (563 U/L) y 24 horas (393,1 U/L) post inoculación. La isoenzima LDH-1 se eleva junto a la LDH-T en infarto

al miocardio [8]. La elevación de la LDH-1 a las 12 y 24 horas coincide con la elevación de la actividad de la LDH-T reportada en este estudio.

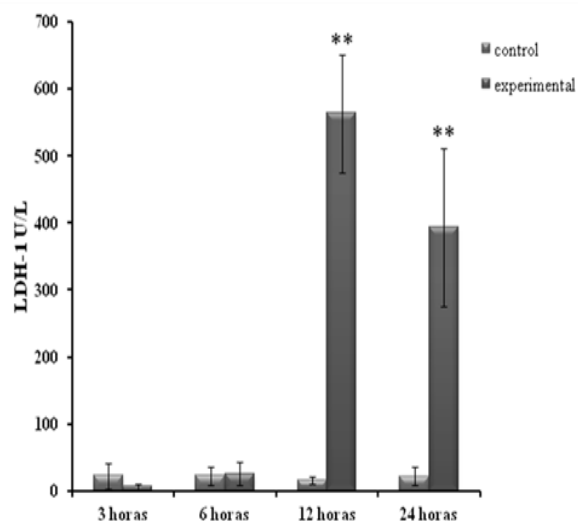
Observando el gráfico 5 se puede apreciar que el comportamiento de la enzima LDH-2 es similar al mostrado por la LDH-1, con aumento altamente significativo a las 12 horas (563 UI/L) y a las 24 horas (3932 UI/L), lo cual es comparable con los criterios de elevación de las enzimas LDH-1 y LDH-2 cuando se conoce el tiempo de aparición de los síntomas, en los cuales los valores de estas isoenzimas es de gran utilidad [12].

En conclusión, este diseño experimental mostró que el veneno de *Crotalus durissus cumanensis* produce un aumento en los niveles séricos de los marcadores cardíacos CK-T, CK-MB, LDH-T, LDH-1 y LDH-2, lo cual puede sugerir daño al músculo cardíaco. Sin embargo, como el veneno de *Crotalus durissus cumanensis* afecta otros tejidos que pueden contener isoformas de CK y LDH, se recomienda realizar estudios bioquímicos e histológicos que determinen que otros tejidos pudieran ser afectados en forma simultánea al daño cardíaco y como consecuencia ser corresponsables del aumento sérico de CK-T y de la LDH-T.

#### AGRADECIMIENTOS

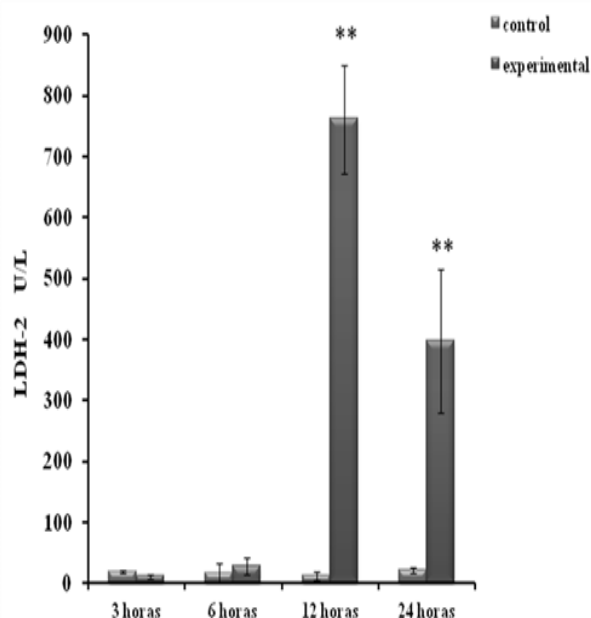
Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado", Proyecto N° 013-VE-2008.

**Gráfico 4.** Niveles Séricos de LDH-1 en ratones NMRI inoculados con veneno de *Crotalus durissus cumanensis*. Los datos representan la media  $\pm$  la Desviación Estándar, n= 5. \* Diferencia significativa respecto al control ( $p<0,05$ ), \*\* Diferencia altamente significativa respecto al control ( $p<0,01$ ).





**Gráfico 5.** Niveles séricos de LDH-2 en ratones NMRI inoculados con veneno de *Crotalus durissus cumanensis*. Los datos representan la media  $\pm$  la Desviación Estándar, n= 5. \* Diferencia significativa respecto al control ( $p<0,05$ ), \*\* Diferencia



## BIBLIOGRAFIA

- [1] Kornacker, P. Lista sistémica y clave para las serpientes de Venezuela. 1era Ed. Rheinbach, Germany: Pako-Verlag. 1999. 270 pp.
- [2] Gutiérrez J. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigación en América Latina. Rev Biol Trop. 2002; 50:337-94.
- [3] Grillo, R. y Scannone, R. H. Fraction of *Crotalus durissus cumanensis* venom by gel filtration. Toxicon 1976. 14(9) 400-403
- [4] Remuzgo, C., Álvarez M.P., Lazo F., Yarlequé A. Caracterización parcial del veneno de la serpiente cascabel peruana *Crotalus durissus terrificus*. Rev. Peru Biol. 2000. 7(1).
- [5] Pirela R. López, J. Hernández, J. Caracterización Toxinológica del Veneno Total de la Serpiente de Cascabel *Crotalus durissus cumanensis* (Viperidae), presente en la Localidad de Porshoure, Revista Científica, FCV-LUZ 2006. Vol. XVI, 3: 232-238.
- [6] Peichoto, M. Teiber, P. Guaimás, M. Leiva, L. Acosta, O. Daño Pulmonar y Renal Causado por el Veneno de *Philodras patagonensis* en Ratas. Universidad Nacional del Nordeste, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. 2005. E-051
- [7] Hernández, M. Finol H. Fernández, I. Scannone, H. Rodríguez, A. Alteraciones Ultraestructurales de

Tejido Cardíaco Tratado con Veneno Crudo de Serpiente de Cascabel (*Crotalus durissus cumanensis*). Revista de la Facultad de Medicina 2005.V.28 n1.

[8] Bhayana, V. y Henderson A.R. Biochemical markers of myocardial damage. Clin Biochem 1995. 28: 1-29.

[9] Rowlands, J. Mastaglia, F. Clinical and pathological aspects of a fatal case of mulga (*Pseudesis australis*) snakebite. Rev. Inst. Med. Trop. 1969. 33:115-122.

[10] Nishimura H, Yazaki Y. Biochemical tests for diagnosis of acute myocardial infarction and estimation of infarct size. Nippon Rinsho 1994. 52: 755-759.

[11] Zhang, J., G.; Ghosh S, Ockleford, C., D.; Galiánes, M. Characterization of an in vitro model for the study short and prolonged effects of myocardial ischaemia and perfusion in man. Clin. Sci. 2000. 99: 443-453.

[12] Aguilar, J. Garabito, R. Infarto Agudo de Miocardio. Revista Pacea de Medicina Familiar 2008. 5(8): 102-114.

[13] Sadner M. Ofidios. Ponzosñosos De Venezuela. "Bothrops venezuelae, sp. Nov. "Novedades Científicas". 1961. N 30.

[14] WORDL HEALTH ORGANIZATION. Progress in the charactrization of venoms and standarization of antivenom. Laboratory manual. Geneva 1981.5-44pp.

[15] Contreras F. Estadística descriptiva y análisis descriptivo con SPSS. Aplicaciones de la Curva Normal. Fondo editorial UNET 2007. Capitulo IX. San Cristóbal. Venezuela. P. 271-321.

[16] Noriega-Alvarado J, Colmenares D, Mogollón A, Márquez N, Hernández V, Pérez M. Cambios séricos en las enzimas ALT, AST, FA, CK-total y LDH inducidos por el veneno de *Crotalus durissus cumanensis* en ratones Balb/C. Rev. Cientif. FCV-LUZ 2009, XIX: 408-409.

[17] Acosta de Pérez, O.; Ruiz, R.; Koscienczuk, P, Sánchez N.; Marcial; Mussart de Coppo, N. 1997. Lesiones Locales y Sistémicas Inducidas por Veneno de *Bothrops alternatus* (víbora de la cruz) de Argentina. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste-UNNE. Argentina.

[18] Cupo, P. Azevedo, M. Hering, E. Absence of myocardial involvement in children victims of *Crotalus durissus terrificus* envenoming. Toxicon 2003.42:741-74.

[19] Sano, I. Thomy, S. Campolina, D. Dias, M. De Castro, MS De Sousa, M. Amaral, C. Resende, N. Kamiguti, A. Warrell, D. Theakston, R. Coagulopathy Following Lethal and non-lethal Envenoming of Human by the South American Rattlesnake (*Crotalus durissus*) in Barzil. Q.J. Med. 2001. 94:551-559.

[20] Charask, A. López, A. Barrero, C. Piombo, A. Bender, D. Santopinto, J. Ibañez, J. Traiber, M., González, M. Mauro, V. Grancelli, H. Hirschson, A. Tajer, C. Característica del infarto agudo de miocardio en la evolución de la angina inestable. Revista Argentina de Cardiología 1996. 64: ( 2) 153-64.

[21] Pandigoso, C., Escobar, E., Yearleke, A. Acción de la miotoxina del veneno de *Bothrops brazili* Hoge (Ophidia, viperidae). Rev. Peru Biol. 2002. (9): 274-83.

[22] Mirajkar, K.K., More, S., Gadag, J.R. Isolation and purification of a neurotoxin from *Bungarus caeruleus* (common Indian krait) venom: biochemical changes induced by the toxin in rats. J.basic Clin. Physiol. Pharmacol. 2005; 16(1):37-52.